



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 197 21 151 A 1

⑯ Int. Cl. 6:
G 01 N 33/543
G 01 N 33/52
A 61 B 10/00

DE 197 21 151 A 1

⑯ Aktenzeichen: 197 21 151.8
⑯ Anmeldetag: 21. 5. 97
⑯ Offenlegungstag: 26. 11. 98

⑯ Anmelder:
Merck Patent GmbH, 64293 Darmstadt, DE

⑯ Erfinder:
Wahl, Rüdiger, Dr., 22085 Hamburg, DE; Cromwell, Oliver, Dr., 21465 Wentorf, DE; Fiebig, Helmut, Prof., 21493 Schwarzenbek, DE

⑯ Entgegenhaltungen:
DE 1 95 26 675 A1
US 43 31 650
EP 02 03 238 A1
WO 85 02 262
KEMENY, D.M.: ELISA - Anwendung des Enzyme Linked Immunsorbert Assay im biologisch medizinischen Labor, 1994, Gustav Fischer Verlag Stuttgart (u.a.), S. 92;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Streifentest zur in-vitro-Allergiediagnostik

⑯ Die Erfindung betrifft einen Streifentest zur in-vitro Allergiediagnose und ein Verfahren zum Nachweis von spezifischem IgE in Vollblut oder Seren im human- und veterinärmedizinischen Bereich sowie die Verwendung des Streifentests zum Nachweis von Inhalations-, Nahrungsmittel-, Kreuzreaktivitäts- und Mediterranallergenen.

DE 197 21 151 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft einen Streifentest zur in-vitro-Allergiediagnostik zur Beurteilung von spezifischem Immunoglobulin E (IgE) in Seren und Vollblut von Allergikern.

Man kennt verschiedene Methoden der in-vivo- und in-vitro-Allergiediagnostik. Der in-vitro Allergiediagnostik kommt neben der in-vivo-Allergiediagnostik, die beispielsweise Haut-, Prick-, Intracutan und Provokationstests umfaßt, eine immer größere Bedeutung zu, da das Allergenspektrum sich stets vergrößert und eine in-vivo Testung in vielen Fällen aufgrund von Nebenwirkungen für den Patienten nicht durchführbar ist.

Für zahlreiche neue Allergene stehen zudem vielfach keine kommerziellen Testlösungen zur Verfügung, da der Aufwand für die Extraktherstellung und somit auch für die Testlösungsherstellung häufig nicht im Verhältnis zur Patientenzahl steht, wenn es sich um seltene Allergien handelt. Zu nennen wären hier u. a. die Berufs-Allergene, wie sie z. B. in Hölzern, Rohkaffee, Hygienegebrauchsartikeln wie z. B. Latexhandschuhen etc., vorkommen, die oft nur kleine Gruppen betreffen. Bei hochgradigen Allergikern kann es bei in-vivo Testungen mit neuen, noch nicht ausreichend charakterisierten Allergenlösungen zu unzumutbaren Nebenwirkungen kommen, die das Wohlbefinden erheblich beeinträchtigen. Die in-vitro-Diagnostik dagegen hat den Vorteil, daß sie für den Patienten völlig ungefährlich ist, da die Testung mit dem Serum des Patienten außerhalb des Organismus durchgeführt wird.

Im Rahmen der in-vitro Bestimmung von spezifischem IgE und Gesamt-IgE in Seren von Patienten spielt das IgE die entscheidende Rolle. IgE (Immunglobulin E) ist ein Eiweißstoff und aus serologischer Sicht hauptverantwortlich für das Krankheitsbild einer Allergie.

Bekannt ist bisher die in-vitro-Bestimmung von Allergien durch den Allergenscheiben-Test, der von Johansson, Wide und Bennich entwickelt wurde und in Lancet 2, 1105-1107 (1967) beschrieben ist. Dieses Verfahren stellt den heute am häufigsten benutzten Test dar. Es ist gleichzeitig das erste Testsystem, um spezifisches IgE in Seren von Allergikern zu messen. Ähnliche Testsysteme sind z. B. in EP 203 238 beschrieben.

Alle diese bekannten Tests können nur mit aus Vollblut hergestellten Seren durchgeführt werden und sind nur mit einem größeren experimentellen Aufwand durchführbar, d. h. sie sind aufwendiger hinsichtlich der Ausführung und Auswertung.

Ferner ist es für viele Patienten wichtig, daß eine in-vitro-Testung eine Vielzahl von Allergenen, wozu auch seltene Allergene, wie z. B. Latex gehören, abdeckt, um so eine genaue und zuverlässige Diagnose zuzulassen. Ein weiterer Nachteil der bisher bekannten Tests ist neben einem unzureichenden Allergenspektrum, welches diese Tests abdecken, eine aufwendige und langwierige Durchführung, die nicht von jedermann auf einfache Weise ausgeführt und insbesondere auch nicht ausgewertet werden kann. Zudem sollte ein solcher Test sowohl im human-medizinischen Bereich, als auch in der Veterinärmedizin zur Diagnose eingesetzt werden können und gleichermaßen mit Serum und Vollblut durchgeführt werden können, ohne daß hierbei das Ergebnis verfälscht wird.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, einen auf einfache Weise zu handhabenden Streifentest zur in-vitro-Allergiediagnostik zu entwickeln, der sowohl mit Serum als auch mit Vollblut durchgeführt werden kann und eine ausreichende Anzahl von Allergenen einschließt.

Gegenstand der Erfindung ist ein Streifentest für die in-vitro Diagnose zur Beurteilung von spezifischem IgE da-

durch gekennzeichnet, daß der Test sowohl mit Vollblut als auch mit Serum durchgeführt werden kann.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Streifentest für die in-vitro Diagnose zur Beurteilung von spezifischem IgE in Seren und/oder Vollblut dadurch gekennzeichnet, daß jeder Stick mit jeweils einer Positiv-, einer Negativkontrolle und einem bis neun verschiedenen Allergenen beschichtet ist.

Der Streifentest dient zur Beurteilung von spezifischem IgE in Vollblut oder Seren von Allergikern und kann neben dem Humanbereich gleichermaßen auch im Veterinärbereich eingesetzt werden. Die Auswertung erfolgt vorzugsweise visuell durch Vergleich mit einer Farbkarte. Dabei werden die entstehenden Färbungen der Allergenpads auf dem jeweiligen Teststreifen mit einer vorgegebenen Farbskala verglichen. Die Farbintensität ist dabei der Indikator für den Befund der Allergiediagnose.

Ein typischer Allergenstrich umfaßt vorzugsweise 9 Allergene, eine Negativ- und eine Positivkontrolle. Ein Komplettest beinhaltet vorzugsweise unterschiedliche Allergiestreifen aus verschiedenen Bereichen. Hierzu gehören beispielsweise Gräser/Getreide/Kräuter (G/G/K), Tiere/ Federn/Milben (T/F/M), Bäume (B), Pilze (P), Nahrungsmittel (NM), Screening (S) [Phadiatop].

Ein typisches Allergenspektrum ist in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet. Hinzu kommen zu diesen Standardallergenen noch Allergene spezieller Art, wie sie beispielsweise in Röstkaffee, bestimmten Hölzern, Insektenäpfchen, Medikamenten, Latex etc. vorkommen.

30	Baumpollen (B)	Gräser/Getreide/Kräuter (G/G/K)
35	Birke	Beifuß
	Eiche	Gerste
	Erle	Glaskraut
	Hasel	6-Gräser
	Pappel	Hafer
	Platane	Ragweed
	Rotbuche	Roggen
	Ulme	Wegerich
	Weide	Weizen
40	Neg. Kontrolle	Neg. Kontrolle
	Pos. Kontrolle	Pos. Kontrolle
45		
50	Tiere/Federn/Milben (T/F/M)	Pilze (P)
	Dermat. pter.	Alternaria tenuis
	Dermat. far.	Aspergillus fum.
	Federmix (Gans, Huhn, Ente)	Botrytis cinerea
55	Goldhamster	Cladosp. herbarum
	Hund	Curvularia lunata
	Kaninchen	Fusarium monoliforme
	Katze	Helminthosporium halodes
	Meerschweinchen	Penicillium notatum
60	Pferd	Rhizopus nigricans
	Neg. Kontrolle	Neg. Kontrolle
	Pos. Kontrolle	Pos. Kontrolle
65		
	Nahrungsmittel (NM)	
	Erdnuß	

Nahrungsmittel (NM)

Haselnuß
Hühnerei
Kabeljau
Krabbe
Kuhmilch
Roggenmehl
Sellerieknotte
Soja
Neg. Kontrolle
Pos. Kontrolle

Gebrauchsstoffe
Latex
Neg. Kontrolle
Pos. Kontrolle

Ein handelsüblicher Test der vorliegenden Erfindung ent- 20
hält beispielsweise

- Inhalationsallergen-Teststreifen
- Nahrungsmittelallergen-Teststreifen
- Kreuzreaktivitätsallergen-Teststreifen sowie 25
- Mediterran-Allergenteststreifen.

Die erfindungsgemäßen Teststreifen werden als AllergodipTM bezeichnet. Die zuvor genannte beispielhafte Zusam- 30
mensetzung eines solchen AllergodipTM-Testsystems in be-
zug auf die zu testenden Allergene kann folgendermaßen
aussehen:

Die Code-Nummern wurden dem Allergenscheibenkatalog
(Allergopharma) Stand Oktober 1993 entnommen:

Allergodip-Zusammensetzungen						
Inhalation	Code-Nr.	Nahrung	Code-Nr.	Kreuz	Code-Nr.	Mediterr.
Gras	gx 801	Hühnerei	f 74	Blrke	f 03	Gras
Roggeng.	g 12	Kuhmilch	f 02	Erle	f 02	Parlteria
Blrke	f 03	Roggenm.	f 05	Hasel	f 04	Blrke
Bellfuss	w 06	Erndnuß	f 13	Apfel	f 40	Obbaum
Wegerich	w 09	Haselnuß	f 17	Haselnuß	f 17	Wegerich
Hund	e 02	Sellerie	s 801	Karotte	f 31	Rapweed
Katze	e 01	Sojabohn	f 14	Pfirsich	f 95	Katze
Allomaria	m 08	Krabbe	f 23	Bellfuss	w 08	Allomaria
D.pleron.	d 01	Kabeljau	f 03	Sellerie	s 801	D.pleron.
Negativk.	k 805	Negativk.	k 805	Negativk.	k 805	Negativk.
Positivk.	AP	Positivk.	AP	Positivk.	AP	Positivk.

* hier officinales

** hier short

Weitere typische Komponenten des Testsystems sind ferner Patientenkarten oder Patienten-Farbketten, Testglasröhren mit Markierung, Testständer, Konjugat, Substrat, Einmalpipetten und eine Vorschrift zur Durchführung und Auswertung des Tests. Das Konjugat ist vorzugsweise AP-Anti-IgE oder POD-Anti-IgE, das Substrat bevorzugt AP-purple IgE, TMB präzipitierend oder BM-purple (5-Brom-chlor-indolylphosphat-Nitroblautetrazolium).

Der Test wird vorzugsweise bei Raumtemperatur durchgeführt.

Der Test kann ferner in Form eines 1-Tages- und eines 2-Tagestests ausgeführt werden. Beide Tests unterscheiden sich hauptsächlich in der Zeitspanne der Inkubation mit Konjugat und Substrat. Ferner kann der Test mit Vollblut oder mit aus Vollblut hergestelltem Serum durchgeführt werden.

Die einzelnen Teststreifen werden vorzugsweise durch Bromcyan-Aktivierung, wie sie auch von der Allergenscheiben-Testung her bekannt ist, hergestellt.

Zur Herstellung des Allergodip werden BrCN-aktivierte Papierbögen verwendet. Die BrCN-Aktivierung der Papierbögen erfolgt vorzugsweise in Anlehnung an die Allergenscheibenaktivierung, wobei Mengen und Volumina deutlich reduziert wurden.

Cellulosepapier wird mit BrCN aktiviert. An die aktivierte Papiere werden die Allergene kovalent gekoppelt. Pro BrCN aktivierte Papierbogen (DIN A4) wird ein Allergen gekoppelt. 4 mm breite Streifen werden geschnitten und auf einen Plastikstreifen (DIN A4) geklebt. Auf den Plastikstreifen werden übereinander z. B. 9 unterschiedlichen Allergene, eine Positiv- und eine Negativkontrolle geklebt. Der DIN A4 Plastikstreifen wird in 4 mm breite Plastikstreifen (Allergodips), die ca. 7 cm lang sind, geschnitten.

Die Herstellung der Allergenteststreifen erfolgt vorzugsweise derart, daß aus den allergengekoppelten Bögen 4 mm breite Streifen geschnitten werden. Diese Streifen werden auf eine Polystyrolplatte, ca. 30 cm lang und 8 cm breit, mittels eines beidseitigen Klebebands übereinander geklebt.

Die unterschiedlichen Allergenstreifen werden übereinander geklebt und fest angedrückt. Die so vorliegenden mit Allergenstreifen beklebten Polystyrolplatten werden jetzt über Nacht mittels einer speziell entwickelten Presse bei Raumtemperatur gepreßt. Nach der Pressung werden aus der Allergen-beklebten Polystyrolplatte mittels einer Schneidemaschine 4 mm breite Allergodip (Streifen) geschnitten. Die Streifen werden in Röhrchen mit Trockenstopfen à 10 Stück gelagert, etikettiert und bei -20°C gelagert. Sie sind unter diesen Bedingungen mindestens 2 Jahre stabil.

Zur Markierung, um welchen Streifen es sich handelt, z. B. Bäume, wird die Polystyrolplatte ebenfalls oben farblich markiert. Jeder Allergodip hat eine andere Farbe oder hat eine genaue Bezeichnung, z. B. "Inhalation".

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von spezifischem IgE in Vollblut oder Serum, das dadurch gekennzeichnet ist, daß mindestens die folgenden Schritte nacheinander ausgeführt werden:

1. Pipettierung des Serums oder Vollblutes in ein Teströhrchen;
2. Inkubation mit dem Teststreifen (AllergodipTM);
3. Waschen unter fließendem Wasser;
4. AllergodipTM-Inkubation mit dem Konjugat;
5. Waschen;
6. AllergodipTM-Inkubation mit dem Substrat;
7. Kurzes Trocknen mit Fließpapier;
8. Abgleich gegen die Farbkarte oder Abgleich und Dokumentation mittels der kombinierten Patienten-Farbkarde oder einer separaten Farbskala.

Der Test kann in Form eines 1-Tages- oder 2-Tages-Tests durchgeführt werden:

1-Tages-Test

- Der Allergodip wird in einem Teströhrchen 6,5 mm x 7 cm mit dem Serum 30 Min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Der Streifen wird dann 2-5 Min. im Ultraschallbad oder unter fließendem Wasser gewaschen.
- Der Streifen wird mit AP-Anti-IgE 2-3 Std. bei 20-40°C inkubiert.
- Der Streifen wird dann wiederum 2-5 Min. im Ultraschallbad oder unter fließendem Wasser gewaschen.
- Der Streifen wird mit Substrat 115 Std. bei Raumtemperatur inkubiert.
- Der Streifen wird mit Filterpapier getrocknet, und die Farbreaktion wird gegen eine Farbkarte (eventuell

Densitometer) beurteilt.

2-Tages-Test

- Der Allergodip wird in ein Teströhrchen mit dem Serum 3 Std. bei Raumtemperatur inkubiert.
- Waschung analog dem 1-Tages-Test.
- Der Allergodip wird mit AP-Anti-IgE über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.
- Waschung analog dem 1-Tages-Test.
- Der Streifen wird mit Substrat 1,5 Std. bei Raumtemperatur inkubiert.
- Der Streifen wird mit Filterpapier getrocknet, und die Farbreaktion wird gegen eine Farbkarte (eventuell Densitometer) beurteilt.

Über die Blaufärbung der Allergenpads wird durch Vergleich zu einer Farbkarte die Höhe des spez. IgE-Spiegels in dem Serum des Patienten bestimmt. Es erfolgt eine Einteilung in die Klassen 0-4.

Man benötigt neben den Teststreifen die folgenden weiteren Reagenzien:

Konjugat

Als Konjugat wird vorzugsweise AP-Anti-IgE-Konjugat verwendet. Es kann aber auch POD-Anti-IgE verwendet werden. Dieses wird dann mit präzipitierendem TMB als Substrat kombiniert.

Substrat

Als Substrat wird vorzugsweise AP-purple eingesetzt. Alternativ kann beispielsweise auch BM-purple verwendet werden.

Waschlösung

Als Waschlösung wird vorzugsweise eine 0,9%ige NaCl-Lösung eingesetzt + 1% TWI:IN 20 + 0,05% NaNO₃. Die Waschlösung wird bevorzugt als 1:15 Konzentrat entsprechend verdünnt.

Untersuchungen haben gezeigt, daß zur Waschung Leitungswasser im Ultraschallbad verwendet werden kann. Auch kann eine Waschung unter dem Wasserhahn (2 Minuten) erfolgen.

Zur Durchführung des Allergodip werden unterschiedliche Gerätschaften benötigt, wie z. B. ein Ultraschallbad, kalibrierte Reagenzglasröhrchen Halterung für Allergodip, Ständer für die Reagenzglasröhrchen, Einmalpipetten und eine Farbkarte. Die Ultraschallbadwaschung kann durch Waschung unter dem Wasserhahn ersetzt werden.

Um vorzugeben, wieviel Serum + Reagenzien pipettiert werden müssen werden vorzugsweise kalibrierte Reagenzglasröhrchen (0,9 ml) benutzt.

Die Röhrchen sollen zweckmäßigerweise in Kunststoff- oder Plexiglasständer gestellt werden.

Die Waschung der Allergodip kann im Ultraschallbad erfolgen, das mit der Waschlösung gefüllt wird. Eine Waschung unter dem Wasserhahn ist jedoch ebenfalls möglich.

Um die Allergieteststreifen in das mit Waschlösung gefüllte Ultraschallbad zu hängen, wird eine spezielle Halterung benötigt, bestehend aus einer Plexiglasscheibe, in die Nuten für die Halterungsklammern eingefräst sind. Auch sollte eine Halterung der Streifen für das Waschen unter dem Wasserhahn benutzt werden.

Nach Testende müssen die Allergieteststreifen kurz mit Fließpapier abgetupft werden, um dann abgelesen werden

zu können.

Die Auswertung der Allergodip erfolgt über eine Farbkarte, die den Färbungen angepaßt ist, die dem 1- bzw. 2-Tages-Test entsprechen. Die Farbkarte ermöglicht eine Klassifizierung von Klasse 0-4.

Der Allergodip wird als 1- und 2-Tages-Test angeboten.

Zur Dokumentation der Ergebnisse wird vorzugsweise eine Patientenkarte verwendet. Die Karte gibt u. a. die Allergenzusammenstellung wieder und ist für jeden Teststreifen individuell farblich kodiert.

Gegenstand der Erfindung ist ferner die Verwendung des Streifentests zur in-vitro-Allergiediagnose im human- und veterinärmedizinischen Bereich. Insbesondere kann der Streifentest zum Nachweis von Inhalationsallergenen, Nahrungsmittelallergenen, Kreuzreaktivitätsallergenen oder Mediterranallergenen und zur Diagnose der damit verbundenen Allergien eingesetzt werden.

Als Reagenzpapier können alle saugfähigen Matrizes verwendet werden, die üblicherweise für solche Tests im Gebrauch sind. Am weitesten verbreitet ist die Verwendung von Filterpapier, jedoch können auch andere saugfähige Cellulose- oder Kunststoffprodukte eingesetzt werden. Die saugfähigen Träger, vorzugsweise Filterpapier, werden in an sich bekannter Weise mit Tränklösungen imprägniert, die die zur Bestimmung von Chlor notwendigen Reagenzien enthalten. Die getränkten und getrockneten Papiere können zu quadratischen bzw. rechteckigen Zonen verarbeitet werden die ihrerseits in bekannter Weise auf die Trägerfolie, z. B. Kunststofffolien, Papier- oder Metallstreifen aufgeklebt bzw. aufgesiegelt werden können. Die Klebefläche ist auf einen Bruchteil der Reagenzpapierfläche beschränkt, z. B. auf 10 bis 20%. Die Reagenzpapiere können auch vor dem Imprägnieren in Streifenform auf ein Kunststoffband aufgebracht, und nach dem Imprägnieren senkrecht zur Streifenrichtung in handliche Stäbchen geschnitten werden.

Die nachfolgenden Beispiele dienen dazu, die Erfindung näher zu erläutern, diese aber keinesfalls zu beschränken.

Beispiel 1

Allergenkopplung an BrCN-aktivierte Filterpapiere zur Herstellung der Teststreifen (Allergodip)

Alle Angaben beziehen sich auf eine Allergenkopplung an einen BrCN-Filterpapierbogen von der Größe 16 x 26 cm = 416 cm² und einer Proteinvorgabe von 10 µg/ml Allergenverdünnungslösung.

In einer Metallschale ist es zweckmäßig nur ein BrCN-Filterpapierbogen zu inkubieren.

Für die Allergenkopplung hat sich die Herstellung von 6 Allergenblättern in einem Arbeitsgang als praktikabel erwiesen.

Eine Schaumbildung führt bei proteinhaltigen Lösungen zu unkontrollierbaren Denaturierungen von Proteinen. Schaumbildung durch heftiges Schütteln oder Rühren ist daher zu vermeiden.

Durch Inkubation einer Allergenlösung mit Bromcyan-aktivierten Filterpapierbogen (Herstellung siehe PA 6.02.03) werden Allergene durch Ausbildung einer kovalenten Bindung immobilisiert.

Zur Kopplung des jeweiligen Allergens werden 115 ml Allergenkopplungslösung in eine Inkubationsschale gegeben. Die Schale wird so bewegt, daß der Bogen vollständig mit Allergenkopplungslösung bedeckt ist. Inkubation: IKA-Schüttler, Geschwindigkeit: 45 Mot/min, 4°C, über Nacht.

Zwischen den einzelnen Schritten werden jeweils Waschungen durchgeführt (Waschlösungen s. nachfolgende

Seite).

5-10 ml Allergenlösung für die Proteinbestimmung entnehmen.

Allergenlösung möglichst vollständig dekantieren bzw. absaugen.

Waschlösung Nr. 1

1 x 120 ml. 10 Min. bei 4°C auf dem IKA-Schüttler bewegen.

1 x 120 ml. 3 h bei 4°C auf dem IKA-Schüttler bewegen.

Waschlösung Nr. 2

3 x 120 ml. je 10 Min. bei 4°C auf dem IKA-Schüttler bewegen.

Waschlösung Nr. 3

2 x 120 ml. je 10 Min., bei 4°C auf dem IKA-Schüttler bewegen.

Papierbogen bis zur Weiterverarbeitung unter Inkubationspuffer aufbewahren.

Es darf dabei kein Schaum entstehen.

Zur Aufbewahrung werden die Testbögen oder -streifen gefriergetrocknet.

Ist die Gefriergetrocknung nicht direkt nach der Allergenkopplung möglich, werden die Allergenbogen einzeln, luftdicht und ohne Puffer in Folienenschlauch eingeschweißt und bei 20°C zwischengelagert.

Gefriergetrocknet werden die Bogen oder Streifen ohne Puffer, einzeln in GT-Schalen. Es können 8 Allergenbogen in einem Durchgang getrocknet werden. Eine Gefriergetrocknung über Nacht ist ausreichend.

Nach dem Gefriergetrocknen müssen die Allergenbogen sofort einzeln eingeschweißt und etikettiert werden. Lagerung bei -20°C.

Beispiel 2

Durchführung des 1-Tagestests mit Patientenserum

Bevor die Reagenzien und Allergodip in dem Test eingesetzt werden müssen diese auf Raumtemperatur gebracht werden. Vor Gebrauch Substrat durch vorsichtiges mehrmaliges Kippen mischen. Vor dem Arbeiten Inkubator einschalten, um für die Substratinkubation die Arbeitstemperatur von 37°C zu erreichen.

Patientenserum wird bis zum Ringmarker in die Testglasrörchen pipettiert. Allergodip, der Teststreifen, wird in das Serum gestellt. Alle Allergenpads müssen unter Flüssigkeit stehen.

Die Inkubation erfolgt 30 Min. bei Raumtemperatur. Man verwendet als Substrat AP-purple.

Der Allergodip wird aus dem Serum entnommen und über die Halterung in ein mit Waschpuffer gefülltes Ultraschallbad gehängt. Eine Waschung unter fließendem Wasser (Wasserhahn) ist ebenfalls möglich.

- Alle Allergenpads müssen mit dem Waschpuffer bedeckt sein.
- 5 Min. im Ultraschallbad waschen.
- Sticks entnehmen und kurz mit Filterpapier abtupfen.

Das Konjugat wird bis zum Ringmarker in ein zweites Te-

strörchen pipettiert. Als Konjugat wird AP-Anti-IgE-Konjugat verwendet. Der Allergodip wird in das Konjugat gestellt und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Waschung erfolgt mit dem gleichen Waschpuffer wie zuvor über 5 Min. im Ultraschallbad. Der Allergodip wird entnommen und kurz mit Filterpapier abgetupft. Anschließend wird das Substrat bis zum Ringmarker in drittes Testströrchen pipettiert und der Allergodip in das Substrat gestellt. Die Inkubation erfolgt 3 Stunden bei 37°C im Inkubator. Danach wird der Teststreifen Allergodip aus dem Röhrchen entnommen, mit Filterpapier abgetupft und die Farbreaktion abgelesen.

Die Beurteilung der Ergebnisse erfolgt durch Vergleich mit Farbkarte (1-Tagestest-Klasse 0-4).

Allergodip kann zur Dokumentation aufgeklebt werden. Der Farbkomplex des Teststreifens ist bei Raumtemperatur mindestens ein Jahr stabil.

Beispiel 3

Durchführung des 2-Tagestests mit Patientenserum

Bevor die Reagenzien und Allergodip in dem Test eingesetzt werden müssen diese auf Raumtemperatur gebracht werden. Vor Gebrauch Substrat durch vorsichtiges mehrmaliges Kippen mischen.

Das Patientenserum wird bis zum Ringmarker in die Testglasrörchen pipettiert. Allergodip wird in das Serum gestellt. Alle Allergenpads müssen unter Flüssigkeit stehen. Die Inkubation erfolgt 3 Std. bei Raumtemperatur. Der Teststreifen Allergodip wird aus dem Serum entnommen und mit der Befestigungsklammer bzw. über eine Halterung in ein mit Waschpuffer gefülltes Ultraschallbad gehängt. Alle Allergenpads müssen mit dem Waschpuffer bedeckt sein und werden 2-5 Min. im Ultraschallbad gewaschen. Auch ist eine Waschung unter fließendem Wasser (Wasserhahn) möglich. Anschließend werden die Sticks entnommen und kurz mit Filterpapier abgetupft.

Danach wird das Konjugat AP-A-IgE bis Ringmarker in ein zweites Testströrchen pipettiert und der Teststreifen in das Konjugat gestellt. Die Inkubation erfolgt über eine Zeitdauer von 18 Stunden bei Raumtemperatur.

Danach wird der Teststreifen entnommen und mit einem Waschpuffer (0,9% NaCl, 1% Tween 20, 0,05% NaN₃, Wasser) 2 Minuten im Ultraschallbad gewaschen (Waschung unter fließendem Wasser ebenfalls möglich).

Der Teststreifen wird danach entnommen und mit Filterpapier abgetupft. Anschließend wird das Substrat AP-purple IgE in ein weiteres Testströrchen pipettiert und der Teststreifen für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Schließlich wird der Allergodip-Teststreifen entnommen, mit Filterpapier abgetrocknet und die Farbreaktion abgelesen und ausgewertet. Die Beurteilung der Ergebnisse erfolgt durch Vergleich gegen die Allergodip-Farbkarte (Klassen 0-4). Der Allergodip wird zur Dokumentation in die Patientenkarte geklebt.

Beispiel 4

Testung mit Vollblut (heparinisiert)

Die Testung wird analog zu der Testdurchführung des 1-Tagestests durchgeführt. Sämtliche Zeitintervalle werden beibehalten. Es konnten keine Unterschiede in bezug auf den Serumtest festgestellt werden. Die Farbreaktion war klar und deutlich und entsprach der des Serumtests.

Test zur Serumreduzierung (Pfannentechnologie)

Die Testvorschrift entspricht der von Beispiel 3 (2-Tages- 5
Test) mit folgenden Änderungen:

Die Inkubation mit Vollblut oder Serum erfolgt nicht in
einem Teströhrchen, sondern in einem Kunststoffpfännchen
mit geringerem Volumen. Es werden anstatt 800 µl nur
100–150 µl Vollblut oder Serum eingesetzt. Die Inkubation 10
erfolgt in einer feuchten Kammer (z. B. handelsüblicher ver-
schließbarer Gefrierbehälter), derart, daß ein feuchtes Filter-
papier in diese Kammer gelegt wird. Anschließend stellt
man die mit Serum oder Vollblut gefüllte Pfanne in diese
Kammer und legt den Teststreifen mit der Seite der Aller- 15
genpads in die mit Vollblut oder Serum gefüllte Pfanne hin-
ein. Die Schale wird mit dem Deckel verschlossen; so daß
die Inkubation, wie unter Beispiel 3 beschrieben, durchge-
führt werden kann.

Die weiteren Schritte werden, wie unter Beispiel 3 be- 20
schrieben, beibehalten.

Patentansprüche

1. Streifentest für die in-vitro-Allergiediagnose von 25
spezifischem IgE, dadurch gekennzeichnet, daß der
Test sowohl mit Vollblut als auch mit Serum durchge-
führt werden kann.

2. Streifentest nach Anspruch 1, dadurch gekennzeich- 30
net, daß jeder Stick mit jeweils einer Positiv-, einer Ne-
gativkontrolle und mindestens 9 Allergenen beschich-
tet ist.

3. Streifentest nach Anspruch 1, dadurch gekennzeich- 35
net, daß er jeweils ein Komplettest zum Nachweis von
Inhalationsallergenen, Nahrungsmittelallergenen,
Kreuzreaktivitätsallergenen und Meditarranallergenen
darstellt.

4. Streifentest nach einem oder mehreren der vorher-
gehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß er
in Form eines Testsystems (Kit) vorliegt. 40

5. Streifentest-System nach Anspruch 4 enthaltend 10
Allergen-Dipsticks, Konjugat, Substrat, Patienten-
Farbkarten mit Farbcode zur visuellen Auswertung und
einer Durchführungsvorschrift.

6. Verfahren zum Nachweis von spezifischem IgE in 45
Vollblut oder Serum, dadurch gekennzeichnet, daß min-
destens die folgenden Schritte nacheinander ausgeführt
werden:

1. Pipettierung des Serums oder Vollblutes in ein Te- 50
ströhrchen oder eine Inkubationspfanne;

2. Inkubation mit dem Teststreifen (Allergo-
dipTM);

3. Waschen unter fließendem Wasser oder im Ul-
traschallbad

4. AllergodipTM-Inkubation mit dem Konjugat; 55

5. Waschen;

6. AllergodipTM-Inkubation mit dem Substrat;

7. Kurzes Trocken mit Fließpapier;

8. Entnahme des entwickelten Teststreifens;

9. Abgleich gegen die Farbkarte oder Abgleich 60
und Dokumentation mittels der kombinierten Pa-
tienten/Farbkarte.

7. Verwendung des Streifentests zur in-vitro-Allergie-
diagnose im human- und veterinärmedizinischen Be-
reich. 65

8. Verwendung des Streifentests zur in-vitro-Allergie-
diagnose zum Nachweis von Inhalationsallergenen,
Nahrungsmittelallergenen, Kreuzreaktivitätsallergenen